

## СОСТОЯНИЕ РЕЦЕПТОРНОГО АППАРАТА ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ КОМБИНИРОВАННЫМИ ФОРМАМИ ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА

Н.Н. Попов, А.С. Овчаренко

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

### РЕЗЮМЕ

В работе показано, что лимфоциты больных комбинированными формами генитального эндометриоза характеризуются низкой аффинностью рецепторного аппарата, малой плотностью экспрессии молекул CD3 и Ig на клеточной мембране, нарушением белок-липидных взаимодействий и микровязкости мембраны. В сыворотке больных выявляется повышенное количество р-белков. Проведенный корреляционный анализ полученных данных с показателями функциональной активности лимфоцитов позволил сделать вывод о том, что изменение структурно-функциональных свойств мембраны клеток и их рецепторного аппарата, а также повышенный шеддинг рецепторов являются одной из причин снижения иммунореактивности организма.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** иммунитет, лимфоциты, эндометриоз

### ВВЕДЕНИЕ

Эндометриоз занимает третье место среди гинекологических заболеваний женщин репродуктивного возраста [1, 2, 3]. Около 30-40% больных эндометриозом страдают бесплодием и 30% не вынашивают беременности. Все это указывает на то, что эндометриоз является не только медицинской, но и важной социальной проблемой. В последнее время появляется все больше свидетельств об злокачествленности очагов эндометриоза с развитием эндометриоидных карцином. Все это делает особенно важной проблему своевременной диагностики и адекватной терапии эндометриоза на самых ранних стадиях его развития. Применяющееся в настоящее время хирургическое и гормональное лечение, как правило, сопровождается серьезными нарушениями генеративной функции женщин, большим количеством осложнений и побочных эффектов, а главное, не предупреждает развитие нового эндометриоидного процесса. Эффективность этих методов лечения составляет 40-70% [1, 2, 4]. В последние годы установлено, что иммунные механизмы играют важную роль в развитии эндометриоидного процесса и его генерализации [2, 3, 5, 6, 7, 8]. Установлено, что развитие комбинированных форм генитального эндометриоза происходит на фоне депрессии клеточного звена иммунитета, снижения общего и специфического литического потенциала Т-клеток и НК-лимфоцитов, снижение местных иммунных реакций [3, 9, 10]. Учитывая это, исследователи в последние годы ведут активный поиск эффективных методов иммунокорректирующей терапии, направленной на повышение надзорной функции иммунной системы и включение естественных механизмов в подавление возникновения и развития эндометриоидных гетеротопий [11,

12, 13, 14]. Принимая во внимание, что эффективная патогенетическая иммунотерапия может строиться только с учетом механизмов иммунных расстройств, целью настоящей работы явилось изучение состояния рецепторного аппарата лимфоидных клеток, с которым, как известно, связана их функциональная активность, способность к развитию и реализации иммунных реакций.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ состояния рецепторного аппарата лимфоцитов проведен у 66 женщин, страдающих комбинированными формами генитального эндометриоза. У всех больных диагноз верифицирован лапароскопически и гистологически. Контрольную группу составили 30 здоровых женщин.

О состоянии рецепторного аппарата лимфоцитов судили по их розеткообразующей способности, морфофункциональному показателю аффинности рецепторов, интенсивности флюоресценции клеток, обработанных анти – CD3 и анти – IgG- антителами, меченными ФНТЦ, уровню содержания р-белков в плазме крови. Структурно-функциональные свойства мембран лимфоцитов изучали с помощью зондов АНС, МНКС, ГГБАК. Для всех вышеперечисленных реакций – лимфоциты выделяли из периферической крови на градиенте фиколл-верографина плотностью 1,077 г/мл.

Розеткообразующую активность лимфоцитов изучали в спонтанном тесте с эритроцитами барана (Jondal et.al, 1972) [15] и в реакции активного розеткообразования (Felsburg et.al, 1976) [16].

Морфофункциональный показатель аффинности (МПА) рецепторов лимфоцитов вычисляли по результатам спонтанного и «активного» Е-розеткообразования [17]. В приготовленных и окрашенных мазках под-

считывали 100 лимфоцитов с различным количеством фиксированных на их мембране эритроцитов. В нуль-группу относили свободные лимфоциты, в 1 гр. – лимфоциты с тремя эритроцитами, во 2 гр. – лимфоциты, присоединившие более чем три эритроцита, в 3 гр. – «полные» розетки. Порядковый номер группы умножали на число составляющих ее лимфоцитов. Результаты произведений этих групп суммировали и сумму делили на 100. Полученная в результате деления величина и составляла МПА.

Интенсивность флюоресценции клеток после обработки их анти-CD3 и анти-IgG-антителами, меченными ФИТЦ, измеряли в люминесцентном микроскопе ЛЮАМ-Р8 с помощью приемника света ФЭУ-79 и регистрирующего прибора – электрометрического усилителя У5-7. Обработку клеток антителами проводили в соответствии с методикой выявления маркеров – рецепторов клеток методом мембранной иммуофлюоресценции [18]. Интенсивность свечения клеток выражали в отн.ед. Весь диапазон флюоресценции клеток делили на три равные части, которые оценивали как слабую, средней интенсивности и сильную флюоресценцию: 0,05-0,20 отн.ед. считали слабой, 0,21-0,40 отн.ед. – средней, 0,41-0,60 отн.ед. – сильной флюоресценцией. В каждом образце изучали 200 клеток.

Р-белки в плазме крови определяли по методу, предложенному А.Я.Кульбергом в соавт. [19].

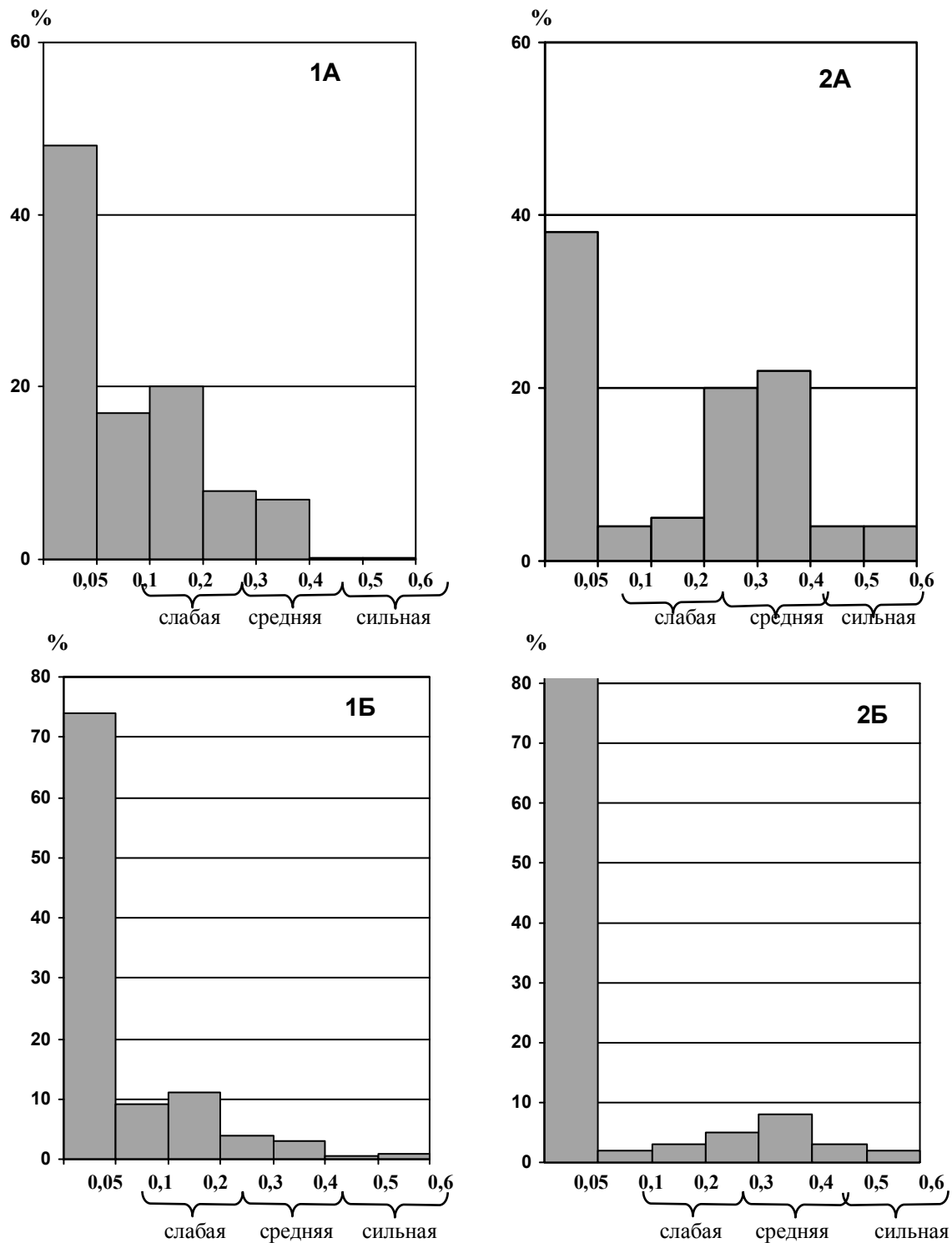
Состояние белок-липидных компонентов мембраны лимфоцитов оценивали спектрофлуориметически по интенсивности флюоресценции зондов [20]. Зонд АНС (анилино-нафталинсульфокислота) флуоресцирует только при адсорбции его белками; МНКС (2-метил-5-нитроизокарбостирил) – при растворении в полярных липидах; ГГБАК (7-гидрокси-6-гексил-3 (2-бензимидазолин-аминокумарин) обладает липофильными свойствами и за счет боковой цепи способен проникать в липидный слой мембраны, где переходит в флуоресцирующую таутомерную форму. Показатели выражали в относительных единицах.

Полученные данные подвергали общей статистической обработке и корреляционно-

му анализу. Для этой цели использовали пакет прикладных программ STATGRAPHICS. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Все данные в таблицах приведены в виде среднего арифметического значения  $M$  и среднего квадратичного отклонения  $m$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что розеткообразующая способность лимфоцитов больных комбинированными формами генитального эндометриоза существенно ниже, чем женщин контрольной группы. Лимфоциты больных формировали  $53,1 \pm 1,8\%$  спонтанных Е-розеток,  $21,6 \pm 0,9\%$  активных Е-розеток. Морфофункциональный показатель аффинности (МФА) рецепторов лимфоцитов в изученных реакциях составлял  $11,6 \pm 0,6$  отн.ед. и  $6,3 \pm 0,4$  отн.ед. У женщин контрольной группы эти показатели соответственно равнялись  $63,8 \pm 2,1\%$  (Е-РОК) и  $35,6 \pm 1,6\%$  (Еакт-РОК); МПА –  $26,3 \pm 1,4$  ед. и  $14,6 \pm 0,9$  ед. При оценке интенсивности флюоресценции клеток, обработанных анти - CD3 и анти – IgG- антителами, меченными ФИТЦ, было установлено, что цитограммы лимфоцитов больных эндометриозом и здоровых женщин существенно различаются (рис.). Как видно на рисунке, в суспензии лимфоцитов больных практически отсутствуют клетки с высокой степенью флюоресценции, в 1,6 раза снижено количество  $Ig^+$ -клеток и в 2,8 раза  $CD3^+$ -клеток со средней степенью флюоресценции, а преобладающее число  $Ig^+$ -клеток (73%) и  $CD3^+$ -клеток (71%) характеризуется слабой флюоресценцией. Среди лимфоцитов здоровых женщин, напротив, основной процент флюоресцирующих клеток ( $57,8\% Ig^+$  и  $67,7\% CD3^+$ ) расположен в зоне средней интенсивности флюоресценции и незначительный процент ( $15,8\% Ig^+$ -клеток и  $16,1\% CD3^+$ -клеток) в зоне слабой флюоресценции. Полученные данные свидетельствуют о том, что в группе больных у преобладающего числа лимфоцитов рецепторы экспрессированы с низкой плотностью и проявляют малую аффинность.



**Рис.** Распределение лимфоцитов, обработанных анти-CD3 (А) и анти-Ig (Б) – антителами, меченными ФИТЦ, в зависимости от интенсивности их флуоресценции. 1- лимфоциты больных эндометриозом; 2- лимфоциты здоровых женщин. По оси ординат процент флуоресцирующих клеток, по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции клеток, отн.ед.

При исследовании уровня р-белков в плазме крови было обнаружено, что их содержание в 1,23 раза выше у больных эндометриозом, чем у здоровых женщин. Уровень р-белков ( $\log_2$ ) у больных составляет  $14,27 \pm 0,94$ , у здоровых женщин –  $11,31 \pm 0,87$  ( $p < 0,05$ ). Эти данные свидетельствуют о том, что у больных эндометриозом интенсифицирован, по сравнению с нормой, шеддинг кле-

точных рецепторов. Проведенный корреляционный анализ подтвердил наличие тесной связи между уровнем р-белков в плазме крови и снижением функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Наличие структурных перестроек в мембранах лимфоцитов больных эндометриозом нами было подтверждено в исследованиях с использованием флуоресцентных зондов (табл.). При

добавлении к лимфоцитам больных зонда АНС, который связывается с белковыми компонентами мембран клеток, наблюдается уменьшение флуоресценции клеток на 26,1%, по сравнению с клетками здоровых женщин; зонда МНКС, растворимого в полярных липидах – снижение на 41,2%; зонда ГГБАК, обладающего липофильными свойствами, - повышение интенсивности флуоресценции на 32,6%.

Таблица  
**Интенсивность флуоресценции АНС-, МНКС-, ГГБАК-обработанных лимфоцитов больных и здоровых женщин**

Зонд	Больные	Здоровые женщины
АНС	134175,9 ± 604,3*	181564,2 ± 631,5
МНКС	30007,2 ± 201,4*	51032,7 ± 235,6
ГГБАК	1744,2 ± 146,3*	1315,4 ± 109,7

\*- p < 0,05 по сравнению с показателями здоровых женщин

Полученные данные, а именно сниженная, по сравнению с нормой, способность лимфоцитов больных к формированию Е-розеток, низкая аффинность их рецепторного аппарата, низкая плотность рецепторов на клеточной мембране, а также нарушение белок-липидных взаимодействий и микровязкости мембран в совокупности с повышенным содержанием р-белков в плазме крови свидетельствует о том, что снижение функциональной активности лимфоцитов у больных эндометриозом, по-видимому, связано с изменением структурно-функционального состояния мембран клеток и их рецепторно-

го аппарата, а также повышенным шеддингом рецепторов. Как известно, рецепторы играют центральную роль во взаимодействии с антигеном, в кооперации клеток, в их активации и реализации всех видов иммунных реакций. Следует учитывать, что р-белки являются также универсальными эндогенными модуляторами, способными управлять метаболической активностью клеток, подавлять иммунные реакции, а также выступать одной из основных первопричин сдвигов в иммунном гомеостазе и биологическом равновесии в организме.

## ВЫВОДЫ

1. Лимфоидные клетки больных комбинированными формами эндометриоза характеризуются рядом изменений мембранно-рецепторного комплекса: нарушение белок-липидных взаимодействий и микровязкости клеточных мембран сочетаются с выраженным шеддингом и низкой аффинностью рецепторного аппарата.
2. Уровень р-белков сыворотки больных эндометриозом превышает их концентрацию у здоровых женщин.

Перспектива дальнейших исследований в данном направлении состоит в поиске иммунофрегающей терапии больных генитальным эндометриозом, позволявшей бы направленно модулировать выявленные иммунологические нарушения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Радецкая Л.Е., Супрун Л.Я. Эндометриоидная болезнь (этиопатогенез, особенности диагностики и лечения). - Витебск. 2000. 115 с.
2. Адамян Л.В., Кулаков В.И. Эндометриозы: Руководство для врачей. - М.: Медицина. 1998. 320 с.
3. Драмлян А.Ф. Новые подходы к патогенезу, диагностике и тактике ведения больных с наружным генитальным эндометриозом. Автореферат докт. дис. 1996. 76 с.
4. Радецкая Л.Е. Эндометриоз, патогенез и принципы лечения. Автореферат докт. дис.. 2001.
5. В.В.Чоп'як, В.М. Беседін, О.В.Беседін./Педіатрія, акушерство та гінекологія. 2000. №4. С.111-114.
6. Старцева Н.В., Швецов М.В. // Материалы Международного конгресса по эндометриозу с курсом эндоскопии. Москва. 1996. С. 63-64.
7. Стрижаков А.Н., Давыдов А.И. Эндометриоз. Клинические и теоретические аспекты. - М.: Медицина. 1995. 309 с.
8. Сельков С.А., Ярмолинская М.И., Григорьева В.В. и др. // Вестник Российской ассоциации акушеров-гинекологов. 1997. №3. С. 40-43.
9. Н.Н.Попов, А.С.Овчаренко. // Проблемы экологии и медицины. 2002. Т 6. № 6. С. 21-24.
10. Овчаренко А.С. // Проблемы экологии и медицины. 2002. Т 6. № 5. С. 26-28.
11. Ткаченко Э.Р., Сулейманова Н.С., Куявская Д.В., и др. // Тезисы докл. Пути развития современной гинекологии. - М. 1995. с. 151.
12. Сельков С.А., Ярмолинская М.М., Григорьева В.В. и др. // Terra Medica. 1998. №1. С. 36-37.
13. Супрун Л.Я., Радецкая Л.Е., Кузьмина О.Н. // Актуальные проблемы иммунологии и аллергологии. Гродно. 1995. С. 62-63.
14. Грищенко В.І., Попов М.М., Щербина М.О. и др. Спосіб корекції дисфункції імунної системи у хворих ендометріозом /Деклараційний патент на винахід 31736А/А61В17/42. 2000 р.
15. Jondal M., Holm G., Wigzell H. // J. Exp. Med. 1972. Vol. 136. №1. P. 207-215.
16. Felsburg P.J., Edelman R., Oilman R.H. // The Journal of Immunology. 1976. Vol. 16. № 4. P. 110-113.
17. Шабалин В.Н., Иваненко Т.В., Скокова Т.В., и др. // Иммунология. 1990. № 6. С. 30-32.
18. В.Штерх, И.Эммурих. Определение клеточных маркеров методом мембранной иммуофлюоресценции. Иммунологические методы. Под редакцией Г.Фриммеля. -М.: Медицина. 1987. С. 254-268.
19. Кульберг А.Я., Бортова Л.М., Кулагина Н.Н. и др. Определение Р-белков в сыворотке (плазме) крови человека. Метод. Рекомендации. - Москва. 1994. 41 с.

20. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. - Москва. 1980.

## СТАН РЕЦЕПТОРНОГО АПАРАТУ ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ КОМБІНОВАНИМИ ФОРМАМИ ГЕНІТАЛЬНОГО ЕНДОМЕТРІОЗУ

*М.М. Попов, А.С. Овчаренко*

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

---

### РЕЗЮМЕ

У роботі показано, що лімфоцити хворих комбінованими формами генітального ендометріозу характеризуються низкою афінністю рецепторного апарату, малою щільністю експресії молекул CD3 та Ig на клітинній мембрані, порушенням білок-ліпідних взаємодій і мікров'язкості мембрани. У сироватці хворих виявляється підвищена кількість р-білків. Проведений кореляційний аналіз отриманих даних з показниками функціональної активності лімфоцитів дозволив зробити висновок, що зміна структурно-функціональних властивостей мембрани кліток і їхнього рецепторного апарату, а також підвищений шедінг рецепторів є одними з причин зниження імунореактивності організму.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ендометріоз, імунореактивність, імунокомпетентні клітини

## THE LYMPHOCYTES RECEPTORS STATE OF PATIENT WITH COMBINED FORMS OF GENITAL ENDOMETRIOSIS

*N.N. Popov, A.S. Ovcharenko*

V.N. Karazin Kharkiv National University

---

### SUMMARY

The work shows, that lymphocytes of the patients with the combined forms of genital endometriosis are characterized by low affinity of receptors, small density expression of CD3 and Ig molecules on a cell membrane, infringement of proteine-lipid interactions and microviscosity of a membrane. In serums of patients the increased quantity of p-proteins was observed. The correlation analysis of the received data with parameters of functional activity lymphocytes has allowed to make a conclusion about the change of structurally-functional properties of a membrane and receptors of them. The last and also raised shedding of receptors are some of the reasons of reduction of immunoreactivity.

**KEY WORDS:** endometriosis, immunoreactivity, immunocompetent cells